

Plasma deficitário de fator V de coagulação

Campo de aplicação - Diagnóstico in vitro para determinação da atividade do fator V da coagulação e detecção do fator V Leiden no plasma humano.

Significado diagnóstico - A determinação do fator V da coagulação no plasma está indicada para a detecção dos estados deficitários congênitos 1 ou adquiridos do fator V. As deficiências congênitas são raras; as diminuições adquiridas de fator V encontram-se nas perturbações da função hepática, na coagulopatia intravascular disseminada, em hiperfibrinolises e tumores 2,3. Uma mutação freqüente do fator V, o fator V Leiden, está associada a um elevado risco tromboembólico 4.

Princípio metodológico - A incubação do plasma deficitário de fator V com plasma de paciente diluído e uma tromboplastina leva a uma ativação dos fatores do sistema extrínseco da coagulação. Mede-se o tempo decorrente desde a adição de tromboplastina até à formação de um coágulo de fibrina. A detecção do fator V Leiden vem descrita no folheto de ProC Global.

Reagentes**Conteúdo da embalagem comercial**

Plasma deficitário de fator V da coagulação (humano)

Embalagem com 8 frascos de 1 ml cada, ref. ORSM

Composição - O plasma deficitário do fator V da coagulação é um plasma humano liofilizado com uma atividade residual do fator V $\leq 1\%$ e é elaborado por imuno-adsorção.

O plasma deficitário do fator V da coagulação contém o neutralizador heparínico hexadimetrinabrometo (5 mg/l) e Manitol (20 g/l) como estabilizador.

Advertências e medidas de precaução

1. Só para uso diagnóstico in vitro.

2. Cada dádiva individual de sangue destinada à preparação de plasma deficitário de factor V foi sujeita a testes de detecção de ABsAg, anti-HCV, anti-HIV1 e anti-HIV2. Na produção foram utilizadas unicamente preparações achadas negativas. Não obstante, todos os materiais obtidos de sangue humano devem ser tratados com as precauções devidas, seguindo as medidas de segurança recomendadas em caso de risco biológico, uma vez que nunca se pode excluir inteiramente o risco de contaminação por agentes patogênicos 5.

Preparação dos reagentes - Dissolver o conteúdo do frasquinho num ml de água destilada. Antes de usar, deixar repousar durante 15 min., no mínimo, à temperatura de entre +15 a +25 °C e, seguidamente, misturar agitando com cuidado (sem formação de espuma). Antes de usar, agitar com cuidado uma vez mais.

Reagentes PT: Utilização de acordo com o respectivo folheto da embalagem.

Estabilidade e condições de conservação - Não aberto e entre +2 e +8 °C, o plasma deficitário pode ser conservado e utilizado até à data indicada no rótulo.

Estabilidade após reconstituição:

+15 a +25 °C, frasco aberto	24 horas
-20 °C	4 semanas*

* não é válido para o uso com ProC® Global

O plasma deficitário pode ser congelado e descongelado 1 vez depois de reconstituído sem perda da atividade de coagulação. Tem de ser mantido bem fechado e congelado tão rapidamente quanto possível. A descongelação deve efetuar-se a +37 °C em 10 min, no máximo, não devendo o plasma então permanecer mais de 2 horas entre

+15 e + 25 °C. Os diversos aparelhos de medição da coagulação possuem características de estabilização individuais.

Outros materiais necessários

Thromborel® S, ref. OUHP ou
Dade® Innovin® , ref. B4212 ou
Dade® Thromboplastin C PLUS*, ref. B4216
Solução tampão de imidazol, ref. OQAA ou
Solução tampão de acetato de dietilbarbiturato, ref. ORHW ou
Dade® Tampão Veronal de Owner, ref. B4234 ou
Tampão sistema CA Dade®, ref. B4265 ou
Soro fisiológico
Plasma humano standard, ref. ORKL
Plasma de controle N, ref. ORKE
Plasma de controle P, ref. OUPZ
Coagulômetro (veja capítulo “Limitações de execução do teste”)
Para a detecção de FV-Leiden:
ProC® Global, ref. OQLS
Plasma de controle ProC®, ref. OQKE
* Patente EUA N.º 5,270,451
Patente Européia N.º 0396733
Outras patentes pendentes

Material a investigar - Para obtenção do plasma, misturar cuidadosamente, 1 parte de solução de citrato de sódio (0,11 mol/l) com 9 partes de sangue venoso, evitando a formação de espuma. Centrifugar imediatamente durante 10 min, pelo menos, a uma velocidade de, pelo menos, 1.500 x g.
Estabilidade da amostra:

+15 a +25 ° C	3 horas
-20 ° C	4 semanas

Descongelar os plasmas conservados a -20 °C em 10 min a + 37 °C e realizar a determinação dentro das 2 horas seguintes.

Execução do teste - O plasma deficitário de fator V da coagulação pode ser utilizado numa multiplicidade de coagulômetro.
Observar o manual de instruções do fabricante do aparelho!

A. Determinação coagulométrica

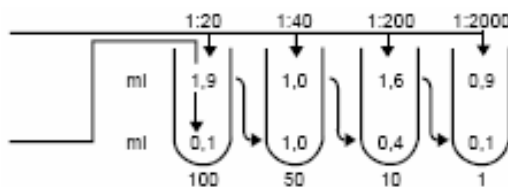
Manual

Preparação da curva de referência - Pode ser utilizado plasma humano standard ou, facultativamente, uma mistura fresca de plasmas citratado provenientes de 10 doadores sãos, no mínimo. Preparar uma série de diluições com solução tampão de imidazol ou solução tampão de acetato de dietilbarbiturato, de acordo com o esquema adiante indicado e determinar os tempos de coagulação tal como indicado em “Execução”:

Diluição

Solução tampão de imidazol ou
Tampão de acetato de dietilbarbiturato

Plasma humano standard % da normal



Se for necessário, podem preparar-se mais diluições. Os tempos de coagulação achados (ordenada) são afetados às atividades do fator V expressas em % (abscissa) em papel logarítmico. Os tempos de coagulação dependem do princípio da medição e, por conseguinte, do coagulômetro utilizado. Por isso, é necessário que cada laboratório prepare uma curva de referência própria.

Execução: Diluir a amostra de plasma na relação 1:20 em solução tampão de imidazol ou tampão de acetato de dietilbarbiturato (levar à temperatura ambiente de +15 a + 25 °C!). Pipetar para um tubo de ensaio previamente aquecido a +37 °C:

Plasma deficitário	100	μ	l
Diluição da amostra	100	μ	l
Deixar incubar exatamente 60 segundos a +37 ° C			
Reagente PT (temperado a + 37 ° C)	200	μ	l
Ao adicionar o reagente PT, acionar o cronômetro ou o ponto de medição no coagulômetro e determinar os tempos de coagulação			

Automática: A pedido, a Dade Behring disponibiliza instruções especiais para coagulômetro.

B. Determinação do fator V Leiden

Veja o folheto da embalagem ProC Global.

Avaliação de resultados - O teor de fator da coagulação do FV lê-se em % da norma com a ajuda da curva de referência. Se o valor teórico declarado para o plasma humano standard não for 100% da norma, mas sim, p. ex., somente 95%, multiplicar o resultado lido por 0,95. Quando os tempos de coagulação correspondem a um teor de fator V superior a 100% da norma, é necessário efetuar novas determinações com diluições mais elevadas (p.ex. 1:40). Para a avaliação, multiplicar os valores de % lidos na curva de referência por um fator de correção correspondente à diluição, p.ex., para uma diluição na relação 1:40, multiplicar pelo fator de correção 2.

Controle interno de qualidade - Intervalo normal: Plasma de controle N

Intervalo patológico: Plasma de controle P. Para cada calibração e a cada 8 horas, no mínimo, em cada dia de trabalho, os controles deverão ser medidos (um no intervalo normal e um no intervalo patológico). Os controles deverão ser tratados como as amostras. Cada laboratório deverá determinar o seu intervalo de controle de qualidade com base nos valores e intervalos teóricos indicados pelo fabricante dos controles, ou com base no intervalo de confiança próprio determinado no laboratório. Se os valores de controle medidos se situarem fora do intervalo de confiança determinado anteriormente, é necessário controlar o reagente, a curva de calibração e o coagulômetro.

Limitações de execução do teste - Os coagulômetro indicados são aqueles para os quais a Dade Behring disponibiliza instruções de utilização. A utilização de plasmas deficitários de fator de coagulação noutros coagulômetro tem de ser validada pelo laboratório de análise. Nesse caso, podem obter-se características de desempenho diferentes das indicadas. Para cada mudança de aparelho e cada lote novo do reagente utilizado e alteração das condições experimentais, a curva de referência tem de ser preparada de novo. A ativação dos fatores de coagulação provocada por uma manipulação inadequada das amostras, pode levar as determinações de fator V falsamente elevadas. Na determinação do fator individual, o anticoagulante lupo pode alterar a atividade de fator efetiva. Nesse caso, observa-se um efeito de diluição, caso o anticoagulante lupo se encontrar na amostra de análise 6.

Valores expectáveis - 70 a 120% da norma 7

Cada laboratório deverá determinar o seu intervalo de referência próprio, com base no método e coagulômetro utilizados.

Características de desempenho do teste

Intervalo de medição - O intervalo de medição para a determinação do fator V situa-se entre 1 e aprox. 100% mas, em caso de necessidade pode ser dilatado para aprox. 200% com uma diluição de amostras superior. (ver acima).

Comparação de métodos - Num estudo foi comparada a determinação do fator V com Thromborel S no sistema BCS** com o sistema BCT**. A correlação (n = 83) revelou um coeficiente de correlação de 0,97, um coeficiente angular de 0,97 e uma intersecção do eixo y de -0,20.

Reprodutibilidade - A reprodutibilidade da determinação do fator V foi controlada no sistema BCS** tanto com plasmas normais, como com plasmas patológicos. Cada uma das amostras foi medida 8 vezes em cada um de 5 dias e avaliada por comparação com uma curva de referência previamente memorizada. Foram revelados coeficientes de variação de aprox. 7,3 a 9,9%.

Bibliografia: Thromborel e ProC são marcas registradas da Dade Behring Marburg GmbH nos EUA, Alemanha e noutros países.

Dade e Innovin são marcas registradas da Dade Behring Inc. Nos EUA, Alemanha e noutros países.

** BCS e BCT são marcas registradas da Dade Behring Marburg GmbH na Alemanha e noutros países.

Diagnóstica São Paulo Produtos e Equipamentos para Laboratórios Ltda.

Av. Indianópolis, 3213 1º andar - Telefax: 5581-0157.

Site: diagnosticasp.com.br - Email: diagnosticasp@sti.com.br